

JP62232392A

MicroPatent Report

PRODUCTION OF L-THEREONINE AND L-ISOLEUCINE

<p>[71] Applicant: KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD</p> <p>[72] Inventors: KATSUMATA RYOICHI; MIZUKAMI TORU; HARA MASAKO; KIKUCHI YASUHIRO . . .</p> <p>[21] Application No.: JP61076298</p> <p>[22] Filed: 19860402</p> <p>[43] Published: 19871012</p> <p><u>Go to Fulltext</u></p>	<p>[No drawing]</p>
<p>[57] Abstract: PURPOSE: To improve the productivity of L-threonine or L- isoleucine, by culturing a microbial strain belonging to Corynebacterium genus, etc., in a medium and producing L-threonine or L-isoleucine in the medium. CONSTITUTION: L-threonine or L-isoleucine is produced and accumulated in a medium by culturing a microbial strain belonging to Corynebacterium genus or Brevibacterium genus having a recombinant DNA of a vector DNA and a DNA fragment carrying a genetic information participating in the synthesis of homoserine dehydrogenase and homoserine kinase of a microorganism belonging to Corynebacterium genus or Brevibacterium genus. The produced amino acid is separated from the culture product. COPYRIGHT: (C)1987, JPO&Japio</p> <p>[51] Int'l Class: C12P01308 C12N00120 C12N01500 C12P01306 C12P01308 C12R00115 C12P01308 C12R00113 C12N00120 C12R00115 C12N00120 C12R00113 C12P01306 C12R00115 C12P01306 C12R00113</p>	

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-232392

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)10月12日

C 12 P 13/08

C-7236-4B

C 12 N 1/20

7115-4B

15/00

7115-4B

C 12 P 13/06

C-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 7 (全12頁)

⑮ 発明の名称 L-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法

⑯ 特 願 昭61-76298

⑰ 出 願 昭61(1986)4月2日

⑱ 発 明 者 勝 亦 瞭 一 町田市成瀬2-12-3 ポプラ丘コープ6-401

⑲ 発 明 者 水 上 透 町田市旭町2-14-10

⑳ 発 明 者 原 雅 子 座間市相模が丘5-40-11

㉑ 発 明 者 菊 池 泰 弘 町田市中町3-9-9

㉒ 発 明 者 岡 徹 夫 横浜市長区奈良町2360-17

㉓ 出 願 人 協和酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

L-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物のホモセリンデヒドロゲナーゼおよびホモセリンキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、培養物中にL-スレオニンまたはL-イソロイシンを生成蓄積させ、該培養物からL-スレオニンまたはL-イソロイシンを採取することを特徴とするL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法。
- (2) ベクターが、コリネバクテリウム属およびブレビバクテリウム属に属する微生物内で複製可能なpCG1、pCG2、pCG4、pCG11、pCE51、pCE52、pCE53、pCE54、pCB101およびそれらから誘導されるプラスミドから選ばれた特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物由来のホモセリンデヒドロゲナーゼおよびホモセリンキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片が、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する宿主微生物にスレオニンまたはイソロイシンのアナログに対する耐性を付与することができるDNA断片であることを特徴とする組換え体DNA。

(4) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物由来のホモセリンデヒドロゲナーゼおよびホモセリンキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物。

(5) 第3表で示されるホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列をコードするDNA。

(6) 第3表で示されるホモセリンキナーゼのアミノ酸配列をコードするDNA。

(7) リジンを生産する能力を有するコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物に、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物のホモセリンデ

ヒドロゲナーゼおよびホモセリンキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片を含む組換え体DNAを導入し、得られる形質転換株を培地に培養し、培養物中にL-スレオニンまたはL-イソロイシンを生成蓄積させ、該培養物からL-スレオニンまたはL-イソロイシンを採取することを特徴とするL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法。

- (8) 第3表のDNA配列において、ホモセリンデヒドロゲナーゼあるいはホモセリンキナーゼをコードするオープン・リーディング・フレームの開始コドンの上流にある120塩基配列およびホモセリンキナーゼをコードするオープン・リーディング・フレームの開始コドンの下流にある60塩基配列またはそれらの一部を含む、コリネバクテリウム属およびブレビバクテリウム属に属する微生物で外来遺伝子を発現させるのに必要なDNA配列。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物のL-スレオニン生合成に関与するホモセリンデヒドロゲナーゼ（以下HDと略す）とホモセリンキナーゼ（以下HKと

略す）の両酵素をコードする遺伝子を含む組換え体DNAをコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物に保有させ、該微生物を培地に培養し、培養物中に生成蓄積したL-スレオニンあるいはL-イソロイシンを採取することを特徴とするL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法に関する。従って、本発明はバイオインダストリーの産業分野に係り、特に、医薬、食品および飼料工業において有用なL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造分野に関する。

本発明は、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物のL-スレオニン生合成に関与するホモセリンデヒドロゲナーゼ（以下HDと略す）とホモセリンキナーゼ（以下HKと

発明が解決しようとする問題点

近年、L-スレオニンおよびL-イソロイシンに対する需要が増大するにつれ、これらのアミノ酸の製造法の改良がますます望まれている。本発明者は、この課題に対処するために、組換えDNA技術によりコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種のL-スレオニンおよびL-イソロイシンの生産能力を向上させるべく研究を行った。

従来の技術

コリネバクテリウム属やブレビバクテリウム属などの微生物を用いる発酵法によるL-スレオニンおよびL-イソロイシンを生産する方法については、該菌種の野生株から誘導された突然変異株を用いる方法がよく知られている。L-スレオニンおよびL-イソロイシンの生産性変異株としては、アミノ酸の栄養要求性変異やアミノ酸のアナログに対する耐性変異あるいはそれらの変異を共有する菌株が知られており、例えば、特開昭47-19087や特公昭54-32070などに記載されている。一方、このような突然変異の付与により育種された菌株とは別に、組換えDNA技

問題点を解決するための手段

コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物のL-スレオニン生合成に係わる酵素のうち、HDとHKの遺伝情報を同時に含む組換え体プラスミドDNAをコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種に導入することにより、L-スレオニンおよびL-スレオニンを前駆体として生合成されるL-イソロイシンの生産性が著しく向上することを見出し、本発明を完成するに至った。コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種由来の遺伝子を含む組換え体プラスミドDNAを用いるL-スレオニンあるいはL-イソロイシン生産菌としては、前記のごとくHD遺伝子を適用した例が知られているが、HD遺伝子とHKをコードする遺伝子（以下HK遺伝子ともいう）の両遺伝子を使用した例は知られておらず、両遺伝子を含む組換え体DNAがL-スレオニンおよびL-イソロイシンの生産性に顕著に寄与することは、本発明により初めて見出されたものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明によれば、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物のHDおよびHK両遺伝子を含むDNA断片とベクターDN

Aとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、培養物中にL-スレオニンあるいはL-イソロイシンを生成蓄積させ、該培養物からL-スレオニンまたはL-イソロイシンを採取することにより、高収率でL-スレオニンまたはL-イソロイシンを製造することができる。

宿主微生物として用いるコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種としては、コリネ型グルタミン酸生産菌として知られる微生物は全て用いることができるが、好適には下記の菌株が使用される。

コリネバクテリウム・グルタミクム
ATCC 31833
コリネバクテリウム・グルタミクム
ATCC 13032
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム
ATCC 13870
コリネバクテリウム・ハーキュリス
ATCC 13868
コリネバクテリウム・リウム
ATCC 15990
プレビバクテリウム・ディバリカツム
ATCC 14020

給源となる微生物としては、コリネ型グルタミン酸生産菌でHDおよびHK活性を有するものであればいかなる微生物でもよく、例えばコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物の野生株あるいはそれから誘導したL-リジン、L-スレオニンまたはL-イソロイシン生産性変異株を用いることができる。これらの菌株の染色体DNAは、本発明者らが特開昭58-126789に示したように、培養中にペニシリン処理した菌体をリゾチームおよび界面活性剤で処理して溶菌した後、常法で除蛋白し、次いでエタノールで沈殿させることにより単離できる。

染色体DNAからHDおよびHK両遺伝子を含むDNA断片を組み込むためのベクターとしては、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種中で自律複製できるものであれば特に限定されないが、例えば本発明者らが開発したpCG1 (特開昭57-134500)、pCG2 (特開昭58-35197)、pCG4、pCG11 (いずれも特開昭57-183799)、pCE54、pCB101 (いずれも特開昭58-105999)、pCE51 (特開昭60-34197) およびpCE52、pCE53 (いずれもモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェ

ネバクテリウム・フラブム

ATCC 14067

プレビバクテリウム・イマリオフィラム

ATCC 14068

プレビバクテリウム・ラクトファーメントム

ATCC 13869

プレビバクテリウム・チオゲニタリス

ATCC 19240

宿主微生物としては、L-スレオニンまたはL-イソロイシン非生産性の菌株を用いることもできるが、好ましくはL-スレオニン、L-イソロイシンまたはL-リジン生産性を有する菌株を用いる。L-スレオニン、L-イソロイシンまたはL-リジン生産性を有する菌株は、アミノ酸要求性変異、アナログ耐性変異またはこれらの変異を組み合わせる公知の変異誘導法によって造成できる (プレスコット・アンド・ダuns・インダストリアル・マイクロバイオロジ (PRESCOTT and DUNN'S INDUSTRIAL MICROBIOLOGY) 第4版、ジー・リード (G. Reed) 編、ザ・エー・ヴィ・アイ・パブリッシング・カンパニー (The AVI Publishing Company Inc. Conn.) 1982, PP. 748-801, ケイ・ナカヤマ (K. Nakayama))。

本発明において、HDおよびHK両遺伝子の供

ネティクス (Mol. Gen. Genet.) 196, 175 (1984) などのプラスミドを使用することができる。プラスミドベクターは、本発明者らが特開昭57-134500あるいは特開昭57-186489に開示したように、菌体をリゾチームおよび界面活性剤で溶菌後、クワイード・ライゼートで調製し、ポリエチレングリコールでDNAを沈殿させ、しかる後にセシウムクロライド-エチジウムブロマイド密度勾配遠心にかけて、CCC-DNAとして単離精製することができる。

HDおよびHK両遺伝子を含むDNA断片とベクタープラスミドとの組換え体は、染色体DNAとベクタープラスミドを制限酵素で切断した後、DNAリガーゼで処理するか、あるいはその切断末端をターミナルトランスフェラーゼやDNAポリメラーゼなどで処理した後、DNAリガーゼを作用させて結合するなどの常法 (メソップ・イン・エンチモロジ (Methods in Enzymology), 68 (1979)) により、種々の組換え体混成物とともに生成せしめることができる。

コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属の菌株から通常の変異操作によって誘導したホモセリン (あるいはメチオニンとスレオニン) 要求性のHD欠損変異株またはスレオニン要求性

でホモセリンを分泌生産するH K欠損変異株を上記組換え体混成物を用いて形質転換し、ホモセリンまたはスレオニンに対して非要求性となった形質転換株を選択することによって、HDおよびH K両遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミドを取得することができる。コリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌株の形質転換法としては、本発明者らが開発したプロトプラストを用いる方法（特開昭57-186492および特開昭57-186489、具体的には実施例に示す）により実施することができる。かくして得られた組換え体プラスミドDNAの中から、HD欠損変異株とH K欠損変異株を再度形質転換したとき両株の欠損形質を復帰させるものを選ぶことにより、HDおよびH K両遺伝子を含む組換え体プラスミドを入手することができる。

以上のようにしてコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌株の野生株の染色体DNAを供与源とした場合には、野生型のHDおよびH K両遺伝子を含む組換え体を得られ、これをコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌株に保有させ、L-スレオニンまたはL-イソロイシンの生産性を向上させることができる。しかしながら、コリネバクテリウム属またはプレバ

ミドを調製できる。

野生型あるいは変異型のHDおよびH K遺伝子を含む組換え体プラスミドは、前記のごときプロトプラストを用いる形質転換法によりコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属微生物に導入できる。これらの組換え体プラスミド保有株によるL-スレオニンまたはL-イソロイシンの生産は、従来の発酵法によるL-スレオニンまたはL-イソロイシン製造に用いられる培養方法により行うことができる。すなわち、該形質転換株を炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地で、好氣的条件下、温度、pHなどを調節しつつ培養を行えば、培養物中にL-スレオニンまたはL-イソロイシンが生成蓄積するのでこれを採取する。

炭素源としてはグルコース、グリセロール、フラクトース、シュクロース、マルトース、マンノース、澱粉、澱粉加水分解物、糖蜜などの炭水化物、ポリアルコール、ビルビン酸、フマル酸、乳酸、酢酸などの各種有機酸が使用できる。さらに微生物の酸化性によって、炭化水素、アルコール類なども用いることができる。特に醗酵蜜は好適に用いられる。

窒素源としてはアンモニアあるいは塩化アンモ

ニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類あるいは尿素および他の窒素含有物ならびにペプトン、N Z-アミン、肉エキス、酵母エキス、コーン・ステープ・リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、燐加水分解物などの窒素含有物など種々のものが使用可能である。

さらに無機物としては、リン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンおよび炭酸カルシウムなどを使用する。微生物の生育に必要とするビタミン、アミノ酸源などは、前記したような他の培地成分によって培地に供給されれば特に加えなくてもよい。

培養は固態培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は一般に20〜40℃が好適である。培地のpHは中性付近に維持することが望ましい。培養期間は通常1〜5日間で培地にL-スレオニンおよび/またはL-イソロイシンが蓄積する。培養終了後、菌体を除去して活性炭処理、イオン交換樹脂処理などの公知の方法で培養液からL-スレオニンおよび/またはL-

ニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類あるいは尿素および他の窒素含有物ならびにペプトン、N Z-アミン、肉エキス、酵母エキス、コーン・ステープ・リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、燐加水分解物などの窒素含有物など種々のものが使用可能である。

さらに無機物としては、リン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンおよび炭酸カルシウムなどを使用する。微生物の生育に必要とするビタミン、アミノ酸源などは、前記したような他の培地成分によって培地に供給されれば特に加えなくてもよい。

培養は固態培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は一般に20〜40℃が好適である。培地のpHは中性付近に維持することが望ましい。培養期間は通常1〜5日間で培地にL-スレオニンおよび/またはL-イソロイシンが蓄積する。培養終了後、菌体を除去して活性炭処理、イオン交換樹脂処理などの公知の方法で培養液からL-スレオニンおよび/またはL-

ーイソロイシンを回収する。

かくしてコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属する微生物のHDおよびHK両遺伝子を含む組換え体プラスミドを保有させたコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属の微生物を用いることにより、高収率でL-スレオニンおよび/またはL-イソロイシンを生産することができる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例

(1) コリネバクテリウム・グルタミカムATCC 31833の染色体DNAとベクターpCE54の調製

NB培地(粉末ブイヨン20g、酵母エキス5gを純水1ℓに含み、pH7.2に調整した培地)で増殖したコリネバクテリウム・グルタミカムATCC31833の種培養を400mlの半合成培地SSM(グルコース20g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g、尿素3g、酵母エキス1g、 KH_2PO_4 1g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4mg、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.09mg、 $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 、

ラスミドpCG2(特開昭58-35197)とエシェリシア・コリのプラスミドpGA22(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.) 140, 400 (1979))を連結せしめたプラスミドである。詳しくはpCG2とpGA22の各々1ヶ所しかないPst I切断部位で両者を和合連結したプラスミドである(第1図参照)。このpCE54はその保有株コリネバクテリウム・グルタミカムATCC39019(ATCC31833から誘導したリゾチーム感受性変異を有する菌株)の培養菌体から次の方法で単離した。

400ml NB培地で30℃で振盪培養し、OD約0.7になるまで生育させた。菌体を集菌しTES緩衝液で洗浄後、リゾチーム溶液10mlに懸濁し、37℃で2時間反応させた。反応液に5M NaCl 2.4ml、0.5M EDTA (pH8.5) 0.6ml、4%ラウリル硫酸ナトリウムと0.7M NaClからなる溶液4.4mlを順次添加し、緩やかに混和してから氷水上に15時間置いた。溶液物を遠心管に移し、4℃で60分間69.400×gの遠心分離にかけ上澄液を回収した。これに重量百分率10%相当のポリエチレングリコール(PEG)6,000

4H₂O 0.04mg、ビオチン 30mgおよびサイアミン塩酸塩1mgを水1ℓに含み、pH7.2に調整した培地)に接種して30℃で振盪培養した。東京光電比色計で660nmにおける吸光度(OD)を測定し、ODが0.2になった時点で培養液中0.5単位/mlの濃度となるようにペニシリンGを添加した。さらに培養を継続し、ODが0.6になるまで生育させた。

培養液から菌体を集菌し、TES緩衝液(0.03Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(以下トリスと略す)、0.005M EDTA(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)、0.05M NaCl、pH8.0)で洗浄後、リゾチーム溶液(25%シロ糖、0.1M NaCl、0.05Mトリス、0.8mg/mlリゾチーム、pH8.0、以下同じ)10mlに懸濁し、37℃で4時間反応を行った。集菌した菌体から斉藤らの方法(Saito, H. et al.: バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta), 72, 619 (1963))に従って高分子染色体DNAを単離した。

ベクターとして用いたpCE54(特開昭58-105999)は、本発明者らが先に特許出願したコリネバクテリウム・グルタミカムのプ

(半井化学薬品社製)を加え、静かに混和して溶解後、氷水上に置いた。10時間後、1.500×gで10分間遠心分離してペレットを回収した。TES緩衝液5mlを加えてペレットを静かに再溶解してから1.5mg/mlエチジウムブロマイド2.0mlを添加し、これに塩化セシウムを加えて静かに溶解し、密度を1.580に合わせた。この溶液を105.000×g、18℃で48時間超遠心分離にかけ、紫外線照射下に検知される遠心チューブ下方の密度の高い位置のバンドを遠心チューブの側面から注射器で抜きとることによってpCE54プラスミドDNAを分離した。この分画液を等容量のイソプロピルアルコール(容量百分率90%イソプロピルアルコール、10%TES緩衝液(この混液中に飽和溶解度の塩化セシウムを含む))で5回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、しかる後にTES緩衝液に対して透析した。

(2) HD遺伝子とHK遺伝子を含むDNA断片のクローニング

上記で調製したpCE54プラスミドDNA 3μgを含む制限酵素Sal I用反応液(トリス10mM、MgCl₂ 6mM、NaCl 200mM、pH7.5)60μℓに6単位の

Sa l I (宝酒造社製) を添加し、37℃で60分間反応後、65℃で10分間加温して反応を停止させた。一方、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833の染色体DNA 8 μgを含むSa l I用反応液140 μlに4単位のSa l Iを添加し、37℃で60分間反応後、65℃で10分間加温して反応を停止させた。

両反応物を混合し、10倍濃度のT4リガーゼ用緩衝液(トリス660 mM, MgCl₂ 66 mM, ジチオスレイトール100 mM, pH 7.6) 40 μl, 5 mM ATP 40 μl, T4リガーゼ(宝酒造社製, 1単位/μl) 0.3 μlおよび純水120 μlを加え、12℃で16時間反応させた。

このリガーゼ反応混合物をコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833由来のリゾチーム感受性変異株から誘導されたK53株〔本菌株はホモセリン要求性(HD欠損)とロイシン要求性の変異を有している〕の形質転換に供した。K53株は昭和60年5月23日付で工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)にFERM P-8257として寄託してある。形質転換には次のように調製されるプロトプラ

ストを用いた。K53株の種培養をNB培地に接種して30℃で振盪培養し、ODが0.6になった時点で集菌した。菌体をRCGP培地(グルコース5 g, カザミノ酸5 g, 酵母エキス2.5 g, K₂HPO₄ 3.5 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgCl₂・6H₂O 0.41 g, FeSO₄・7H₂O 10 mg, MnSO₄・4~6H₂O 2 mg, ZnSO₄・7H₂O 0.9 mg, (NH₄)₂MoO₄・4H₂O 0.04 mg, ビオチン30 μg, サイアミン塩酸塩2 mg, コハク酸二ナトリウム135 g, ポリビニルピロリドン(分子量10,000)30 gを水1 lに含む培地)に1 mg/mlのリゾチームを含む溶液(pH 7.6)に約10⁸細胞/mlとなるように懸濁し、L型試験管に移して30℃で5時間振盪やかに振盪反応してプロトプラスト化した。

このプロトプラスト菌液0.5 mlを小試験管にとり、2,500×gで5分間遠心分離し、TSMC緩衝液(MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 30 mM, トリス50 mM, ショ糖400 mM, pH 7.5) 1 mlに再懸濁して遠心洗浄後、TSMC緩衝液0.1 mlに再懸濁した。この菌液に2倍高濃度のTSMC緩衝液と上記リガーゼ反応液の1対1混合液100 μlを加えて混和し、

次いでTSMC緩衝液中に20%PEG 6,000を含む液0.8 mlを添加して混合した。3分後、RCGP培地(pH 7.2) 2 mlを添加し、2,500×gで5分間遠心分離にかけて上澄液を除去し、沈降したプロトプラストを1 mlのRCGP培地に懸濁してから、0.2 mlをカナマイシン300 μg/mlを含むRCGP寒天培地(RCGP培地に1.4%寒天を含む培地, pH 7.2)に塗抹し、30℃で7日間培養した。

寒天培地上に生育したコロニーをかき集め、生理食塩水で2回遠心洗浄後、生理食塩水1 mlに懸濁した。この菌液をロイシン50 μg/mlおよびカナマイシン20 μg/mlを含有する最少寒天培地M1〔グルコース10 g, NH₄H₂PO₄ 1 g, KCl 0.2 g, MgSO₄・7H₂O 0.2 g, FeSO₄・7H₂O 10 mg, MnSO₄・4~6H₂O 0.2 mg, ZnSO₄・7H₂O 0.9 mg, CuSO₄・5H₂O 0.4 mg, Na₂B₄O₇・10H₂O 0.09 mg, (NH₄)₂MoO₄・4H₂O 0.04 mg, ビオチン50 μg, p-アミノ安息香酸2.5 mg, サイアミン塩酸塩1 mgおよび寒天1 gを1 l中に含み、pH 7.2に調整した培地〕上に再塗布して30℃で3日培養し、ホモセリン非要求性でカナマ

イシンに耐性となった形質転換株を選択した。

これらの形質転換株をNB培地に培養し、その菌体から上記(1)でpCE54を単離したのと同様な方法でプラスミドDNAを単離した。形質転換株の一株から得られ、pChom1と命名したプラスミドは、各種制限酵素での消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、pCE54の唯一のSa l I切断部位に3.6キロボースのSa l I DNA断片が挿入されたプラスミドであることがわかった。このSa l I切断部位は第1図に示すような位置に2ヶ所のPst I切断部位と1ヶ所のEcoR I切断部位を有していた。

pChom1 DNAを用い、上記と同様な方法でK53株のプロトプラストを形質転換し、カナマイシン耐性で選択された形質転換株は、同時にホモセリン非要求性を示し、それから単離されたプラスミドはpChom1と同一の構造を有していた。このことからコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833のHD遺伝子がpChom1上にクローン化されていることが明らかとなった。

HK遺伝子がpChom1上に存在することは次のように確認した。pChom1 DNAを

用いてコリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833から誘導したスレオニン要求性でホモセリン生産性のHK欠損変異株K54(本菌株は昭和60年5月23日付で農工研にFERM P-8258として寄託してある)のプロトプラストを形質転換した。本株のプロトプラストは以下のようにペニシリン処理菌体から調製した。NB培地での種培養0.1mlをスレオニン100 μ g/mlを含む10mlのSSM培地に接種し30℃で振盪培養した。ODが0.15になった時点で0.45単位/mlとなるようにペニシリンGを添加した。さらに培養を続けODが0.6になったところで集菌し、以後前記でK53株のプロトプラストを調製したのと同様な方法でリゾチーム処理してプロトプラスト化した。形質転換も前記と同様に行い、カナマイシン300 μ g/mlを含むRCGP寒天培地で形質転換株を選択した。カナマイシン耐性形質転換株は同時にスレオニン非要求性であった。

この形質転換株を400ml SSM培地で振盪培養し、ODが0.2になったところで0.5単位/mlとなるようにペニシリンGを添加し、さらにOD約0.6まで培養し、集菌した菌体から上記(1)で記載したのと同じ方法で溶菌し、塩化セ

遠心洗浄し生理食塩水に懸濁した。菌懸濁液をカナマイシン20 μ g/mlと α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸(以下AHVと略す)6mg/mlを含む最少寒天培地M1に塗抹して30℃で3日間培養した。出現した1つのコロニーを純化後、前記と同様にして培養菌体からプラスミドを単離し、このプラスミドをpChom10と命名した。

pChom1あるいはpChom10を保有するK53株の培養菌体を生理食塩水で遠心洗浄後、約 10^8 細胞相当の菌をAHV2mg/ml、4mg/mlおよび6mg/mlを含む最少寒天培地M1に塗抹し、両株のAHV耐性を比較した。30℃で3日間培養した結果、pChom1保有株はAHV2mg/mlを含有するM1寒天培地で生育したが、4mg/mlを含む寒天培地では生育できなかった。一方、pChom10保有株はAHV6mg/mlを含有するM1寒天培地でも生育した。

pChom10は、各種制限酵素での切断解析の結果、pChom1と同一の構造を有しており、スレオニン要求性のHK欠損変異株K54の相補能も保持していた。

シウム-エチジウムブロマイド密度勾配遠心でプラスミドを単離した。このプラスミドを各種制限酵素消化後、アガロースゲル電気泳動で解析した結果、pChom1と同一のプラスミドであることが確認された。

以上の結果からpChom1としてクローニングされた3.6キロベースのSa1 DNA切断片にはHDおよびHK両遺伝子が存在していることが判明した。

pChom1上にクローニングされた3.6キロベースのSa1切断片の代表的な制限酵素に対する切断地図を第2図に示した。

(3) 宿主菌に高度の α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸耐性を与える変異型プラスミドの作製

pChom1を保有するK53株をカナマイシン25 μ g/mlを含むNB培地で対数増殖の後期まで増殖させた。菌体を50mMトリス・マレイン酸緩衝液(pH6.0)で2回遠心後、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン400 μ g/mlを含む50mMトリス・マレイン酸緩衝液(pH6.0)に懸濁し室温で30分間処理した。処理菌体と同じ緩衝液で2回遠心洗浄後、NB培地に懸濁し30℃で2時間振盪培養した。培養菌体を生理食塩水で2回

(4) pChom1あるいはpChom10を導入した菌株によるスレオニンの生産

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868、プレバクテリウム・ラクトフェーメントムATCC13869およびリジン生産性菌株プレバクテリウム・フラブムATCC21475(チアリジン耐性)をpChom1およびpChom10で形質転換した。プロトプラストは上記(2)でK54株のプロトプラストを調製したのと同様な方法で調製した。即ち、SSM培地での培養途中でペニシリンG(0.45単位/ml)を添加して処理した培養菌体をリゾチーム処理して調製した。プロトプラストをプラスミドDNA1 μ gを用いて前記と同様な方法で形質転換し、RCGP寒天培地でカナマイシン耐性の形質転換株を選択した。形質転換株から、上記(2)でK54株のpChom1形質転換株からプラスミドを単離したのと同様な方法で、プラスミドを単離し、各種制限酵素での切断解析により、形質転換株がpChom1あるいはpChom10を保有することを確認した。

形質転換株と各々の親株のスレオニン生産試

第 1 表

菌 株	スレオニン生産量 (g/l)
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC31833	0
同 ATCC31833/pChom1	0.4
同 ATCC31833/pChom10	1.9
コリネバクテリウム・ノボキウス ATCC13868	0
同 ATCC13868/pChom1	0.6
同 ATCC13868/pChom10	2.2
プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869	0
同 ATCC13869/pChom1	0.3
同 ATCC13869/pChom10	1.7
プレバクテリウム・フラブム ATCC21475	0
同 ATCC21475/pChom1	0.4
同 ATCC21475/pChom10	5.2

験を次のように行った。NB培地で30℃、16時間低濃培養した種培養0.5mlを生産培地〔グルコース100g、(NH₄)₂SO₄ 20g、KH₂PO₄ 0.5g、K₂HPO₄ 0.5g、MgSO₄・7H₂O 1g、FeSO₄・7H₂O 10mg、MnSO₄・4~6H₂O 10mg、ピオチン100μgおよび炭酸カルシウム20gを水1lに含み、pH7.2に調整した培地〕5mlの入った試験管に接種し、30℃で72時間振盪培養した。培養後、培養液をペーパークロマトグラフィーにかけ、ニンヒドリン発色による比色定量法によりL-スレオニン生成量を測定した。結果を第1表に示す。

(5) pChom1あるいはpChom10を導入した菌株によるイソロイシンの生産

上記(4)と同様の方法でコリネバクテリウム・グルタミカムFERM P-7160、プレバクテリウム・フラブムATCC14067およびリジン生産性菌株コリネバクテリウム・グルタミカムFERM BP-158を形質転換

し、pChom1とpChom10の形質転換株を得た。形質転換株がプラスミドを保有することは前記と同様にして確認した。親株と形質転換株のイソロイシン生産試験を上記(4)と同一条件で行った。

その結果を第2表に示す。

第 2 表

菌 株	イソロイシン生産量 (g/l)
コリネバクテリウム・グルタミカム FERM P-7160	1.2
同 FERM P-7160/pChom1	2.6
同 FERM P-7160/pChom10	5.3
プレバクテリウム・フラブム ATCC14067	0
同 ATCC14067/pChom1	0.6
同 ATCC14067/pChom10	3.7
コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-158	0
同 FERM BP-158/pChom1	0.9
同 FERM BP-158/pChom10	4.8

(6) HDおよびHK両遺伝子のサブクローニング
第2図のSma I 切断部位から3ヶ所あるPvu II 切断部位のうちの右端の切断部位にいたる切断片(太い黒線部分)を含む組換え体プ

ラスミドを次のようにして取得した。

pCE54プラスミドDNA1μgを含むEcoRI用反応液(トリス100mM、MgCl₂ 6mM、NaCl 50mM、pH7.5)20μlにEcoRI(宝酒造社製)を3単位添加し、37℃で60分間反応後、70℃で15分間加熱して反応を停止させた。これにデオキシATPとデオキシTTPを各0.05mM添加し、大腸菌DNAポリメラーゼIラージフラグメント(宝酒造社製)を3単位加え、37℃で30分間反応させ、70℃で15分間加熱して反応を停止させた。

一方、pChom1プラスミドDNA3μgを含むSma I 用反応液(トリス10mM、KCl 20mM、MgCl₂ 6mM、pH7.5)20μlにSma I(宝酒造社製)を3単位およびPvu II(宝酒造社製)を1単位添加し、37℃で60分間反応させた。反応物中から、モレキュラー・クローニング(コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリー、1982)164頁に記載されている方法を用いて、2.6キロベースのDNA切断片を分離、精製した。すなわち、反応物をアガロースゲル電気泳動にかけ、2.6キロベースのバンドを切り出し、透析液中

で電気泳動することによりゲルからDNA切断片を抽出した。抽出液に3倍量のエタノールを添加し、-80℃、10分間冷却したのち、遠心により沈殿を集めた。真空中でエタノールを蒸発させ、20μlのEcoRI用反応液に溶解した。

両反応物を混合し、5mM ATPを5μlとT4リガーゼ(宝酒造社製)を1単位添加し、12℃、16時間反応させた。前記の方法によりK53株のプロトプラストを作成し、このリガーゼ反応物を用いて形質転換を行った。カナマイシン耐性かつホモセリン非要求性を示した形質転換株の1株からプラスミドDNAを前記の方法により調製した。

制限酵素PstIで切断し、アガロースゲル電気泳動で解析した結果、pChom20はpChom1のSalI3.6キロベース挿入断片のうち第1図に示すPstI1.0キロベース断片を含む目的の2.6キロベースの領域をサブクローニングしていることがわかった。

pChom20と命名したこのプラスミドDNAを用いて、K53株およびK54株を再度形質転換して調べたところ、HDおよびHK両遺伝子の相補性を有することが確認された。

その結果を第3表に示す。第3表は2615塩基対より成るSmaI-PvuII DNA断片の塩基配列とその中に存在する2つのオープンリーディングフレーム(塩基322から塩基1557までおよび塩基1571から塩基2497まで)に対応するアミノ酸配列を示している。これらのオープンリーディングフレームがそれぞれHDおよびHK構造遺伝子に相当する。

HDおよびHK活性を、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 58, 311 (1970), 同書 21, 219 (1972)に記載されている方法で測定した結果、K54株のpChom20形質転換株はpChom1形質転換株と同様に、K54株の16倍のHD活性を示し、K53株のpChom20形質転換株はpChom1形質転換株と同様に、K53株の17倍のHK活性を示した。この結果から、SmaIからPvuIIにいたる2.6キロベースの切断片上にHDおよびHK遺伝子が存在することがわかった。

(7) HDおよびHK両遺伝子を含むDNA切断片の塩基配列

pChom1およびpChom20にサブクローニングされたHDおよびHK両遺伝子を含むDNA切断片の全塩基配列をメソーズ・イン・エンザイモロジー101巻, 20頁, 1983年に記載されている方法を用いて決定した。すなわち、常法により制限酵素切断地図を作成したのち、M13ファージ・ベクターにサブクローニングして一本鎖DNAを調製し、ジデオキシヌクレオチドによるチェーンターミネーション法により塩基配列を決定した。

第 3 表

CCCGGGTTGATATTAGATTTCATAAATATACAAAAATCTTGAGAGTCTTTCCGGTTGAA	60
AACAAAAAGCTGGGAAGGTGAATCGAATTCGGGGCTTTAAAGCAAAAATGAACAGCTT	120
GGTCTATAGTGGCTAGGTACCTTTTBTGTTTGACACATGTAGGTGCCGAACAAAG	180
TAAATAGCAACACACGCTCGACCGGATTATTTTGAGAAATCATGACCTCAGCATCTGC	240
CCCAAGCTTTAACCCCGCAAGGTCCCGCTCAACAGTCGAAATGCCCTTTTAGGATTC	300
GGAACAGCTCGCACTGAGGTGATGCTGATGACCGAGTACGGTGAACCTGCGCAC	360
MetArgLeuPheThrGluTyrGlyAspGluLeuAlaHis	
CGCATTGGTGGCCCACTGGAGGTTCTGGCATTCCTGTTCTGATATCTCAAGCCACGT	420
ArgIleGlyGlyProLeuGluValArgGlyIleAlaValSerAspIleSerLysProArg	
GAAGGCTTGCACCTGAGCTGCTCACTGAGGACGCTTTTGCACTCATCGAGCGGAGGAT	480
GluGlyValAlaProGluLeuLeuThrGluAspAlaPheAlaLeuIleGluArgGluAsp	
GTGACATCTGCTTGGGTTTACGGGCAATGAGTACCCACGTGAGGTAGTTCTCGCA	540
ValAspIleValValGluValIleGlyGlyIleGluTyrProArgGluValValLeuAla	
GCTCTGAAGCCCGCAAGTCTGTGTTACCCCAATAGGCTCTTGTTCAGATCACTCT	600
AlaLeuLysAlaGlyLysSerValValThrAlaAsnLysAlaLeuValAlaAspHisSer	
GCTGAGCTTGTGATGACCGGAAGCCCAACCTTGAACCTGTACTTCAAGGCTGCTGTT	660
AlaGluLeuAlaAsnAlaAlaGluAlaAlaAsnValAspLeuTyrPheGluAlaAlaVal	
GCAGGCCCAATCCAGTGGTGGGCCCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	720
AlaGlyAlaIleProValValGlyProLeuArgArgSerLeuAlaGlyAspGlnIleGln	
TCTGTGATGGGATCCTTAACGGCACCACCAACTTCATCTTGGACGCCATGGATTCCACC	780
SerValPheGlyIleValAsnGlyThrThrAsnPheIleLeuAspAlaPheAspSerThr	
GGCGCTGACTATGCAGATTCTTTGGCTGAGGCAACTCGTTGGGTTACGCCGAAGCTGAT	840
GlyAlaAspTyrAlaAspSerLeuAlaGluAlaThrArgLeuGlyTyrAlaGluAlaAsp	
CCTACTGAGACGTCGAGGCCATGACGCCCATCAAGGTCGAATTTGGCATCCATC	900
ProThrAlaAspValGluGlyHisAspAlaAlaSerLysAlaAlaIleLeuAlaSerIle	

1840
CGAGCTGACGCTGAAGTGCTGGATTGCGAGTGGTTGCCAACAAACATTCCEAGTCT
AlaAlaAspAlaGluValProGlyLeuArgValValCysHisAsnAsnIleProGlnSer

1920
CGTGGTCTTGCTTCTCTGCTGCAGCGGGGTTGCTGGTGTTCACACAGCTAATGGTTTG
ArgGlyLeuGlnIleSerSerAlaAlaAlaValAlaGlyValAlaAlaAlaAsnGlnLeu

1980
CGGGATTTTCCGCTGACTCAAGACAGATTGTTCAAGTGTCTCCTCTGCTTTGAAGGCCAC
AlaAspGlnProLeuThrGlnGluGlnIleLeuValGlnLeuSerSerAlaPheGlnGlyHis

2040
CCAGATAATGTCGGGCTTCTGTGCTGGGGCGACAGTGGTGTGCTGGACAAATCTGTCT
ProAspAsnAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaGlyArgValIleSerTrpThrAsnLeuSer

2100
ATCGACGGCAAGAGCCAGCCACAGTATGCTGCTGTACCACTTGAGGTGCAGGATAATT
IleAspGlnLeuSerGlnProGlnTyrAlaAlaValProLeuGluValGlnAspAsnIle

2160
CGTGGACTGCGCTGGTTCTTAATTTCCACDCATCCACCGAAGCTGTGCGCGAGTCTT
ArgAlaThrAlaLeuValProAsnPheHisAlaIleSerThrGluAlaValArgArgValLeu

2220
CCAATCGAATCACTCACATCGATGCGCGATTCAACGTGTCCCGCGTTGCGGTAAGTATC
ProThrGlnGluThrHisIleAspAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaValMetIle

2280
GTTGCATTGCAGCAAGCGCTCTGATCTGCTBTGGAGGGTACTCTGACCACGTGCACAGC
ValAlaLeuGlnGlnIleArgProAsnLeuLeuTrpGlyGlyThrArgAspArgLeuMetGln

2340
CCTTATCGTCGCAAAAGTGTGCCCTTACCTCCGAATGGGTAAACCGCTCTGCACACCGT
ProTyrArgAlaGluValLeuProValIleThrSerGluTrpValAsnArgLeuArgAsnArg

2400
GGCTATGCAGCGTACCTTTTCCGGTGGCGGCCCAACGCCATGGTGTGTCTCCTGACGCCA
GlyTyrAlaAlaTyrLeuSerGlyAlaGlyProThrAlaIleValLeuSerThrGluPro

2460
ATTCACAGACAAAGTGTGGAAAGTGCTCGTGAAGTCTGGCAATTAAGGTCTTGACCTTGAG
IleProAsnArgValLeuGluAspAlaAlaGlnGlnGlyIleLeuValLeuGlnLeuGluIle

2520
GTTGCGGGACAGCTCAAGTGTGAAGTTAAACAACCTTAGGCCAACAGGGAAGCCCCCTT
ValAlaGlyProValIleValGlnGluValAsnGlnProAsn

2580
CGAATCAAGAGGGGGCCTTATTAGTGAGCAATTATTGCTGAACACGTGAACCTTACA

2640
GGTGCCCGGGCGCTTGAGTGGTTAGTTCACAGTG

1 瓩の 2 M NaCl を加え、さらに Sacl 3 単位を加え、37℃で1時間反応させた後、反応物をアガロースゲル電気泳動にかけ、図に記した方法で12.5キロベースの断片を精製し、20 瓩の Hind III 用反応液に溶解した。

pChom21と命名したこのプラスミドDNAはSalI 3.6キロベース断片のうちのHindIII-SalI 2.5キロベース断片をサブクローン化していることを制限酵素による解析で確認した。

K 54株のpChom 20あるいはpChom 21保有株のHDおよびHK活性をジャーナル・オブ・バイオケミストリ(J. Biochem.), 68, 311 (1970)および同書 71, 219 (1972)に記載されている方法で測定した結果、pChom 21保有株のHD活性はpChom 20の15分の1以下であったが、HK活性は6分の5以上保有され

第 4 表

HD : CGATTATTTTGGAGAAATCATGACCTCAGCATCTGCCCCAAGCTTAA
 CCCCAGCAAGGTCCCGGC

HK : TCACCCACTCTGCGCTGGAATCTGATCTTCCCGCACCCTTGAACCTGC
 TGAAGGCTAAGCTCTTTG

TCAGCAGTCGGAATTGCTCTTTTAGGATTCGGAACAGTCGGCCTGAG
 GTGATGCGTCTGATGACC
 MetArgLeuMetThr

TTAAGGCAATCAACAGTGTGATCCGCTCGAAAGGGACTAATTTTACTGA
 CATGGCAATTGAACTG
 MetAlaIleGluLeu

第 5 表

GTTAACCAACCTTAGGCCCAACAAGGAAGCCCTTCGAATCAAGAAAGGGGCTT
 ValAsnGlnProStp

ATTAGTGAGCAA

ていた。このことから、HDの完全発現にはHDの開始コドン上流75ベースに存在するHindⅢ切断部位よりも上流の領域が必要であることが判明した。

第4表に示すように、HD遺伝子のオープン・リーディング・フレームの開始コドンの上流とHK遺伝子のオープン・リーディング・フレームの開始コドンの上流(HD遺伝子のオープン・リーディング・フレームのC末端領域)の120ベース以内に類似配列が存在し、これらの配列が両遺伝子の発現に必要である。さらにHK遺伝子のオープン・リーディング・フレームの終止コドンの下流の60塩基以内には第5表の下線部で示したステム・ループ構造をとる配列があり、コリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属に属する細菌の転写終止シグナルと考えられる。

第4表には上段にHD、下段にHKの配列を示してある。下線部が共通配列である。DNA配列の下に開始コドンから5残基目までのアミノ酸配列を示した。HK開始コドン上流のStpはHDの停止コドンを示している。

第5表には、HKのC末端DNA配列と4残基のアミノ酸配列を示してある。

発明の効果

本発明によれば、コリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属に属する微生物のスレオニン生成に關与するHDおよびHKの遺伝情報を担うDNAとベクタープラスミドとの組換え体DNAを保有させることにより、コリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属菌種におけるL-スレオニンあるいはそれを前駆体として生成されるL-イソロシンの生産性を付与あるいは向上させることができる。

4. 図面の簡単な説明

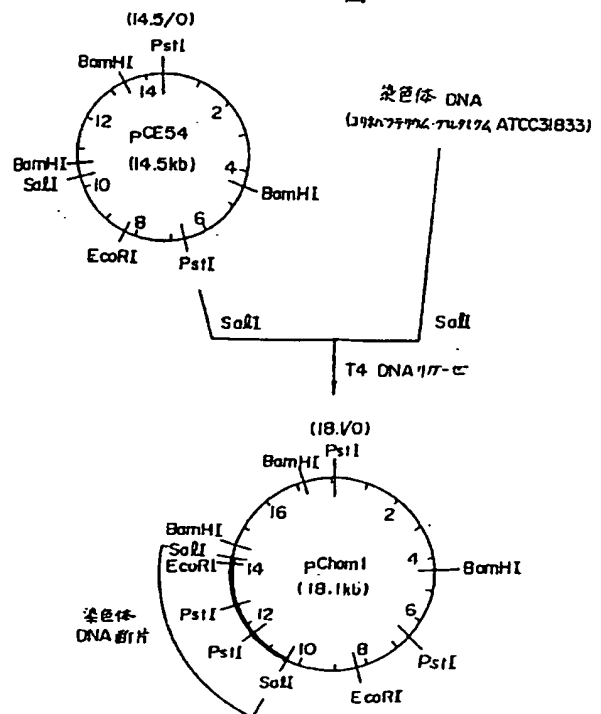
第1図はpChom1の制限酵素SalI、PstI、EcoRIおよびBamHIの切断地図とその作製工程を示す。プラスミドの分子量はキロベース(Kb)で表示されている。pChom1の太い実線部分の染色体DNA断片上にHDおよびHK両遺伝子が含まれている。

第2図は、pChom1上にクローニングされた3.6キロベースのSalI切断片の代表的な制限酵素に対する切断地図を示す。

特許出願人 (102) 協和 発酵 工業 株式会社

代表者 加 藤 幹 夫

第 1 図



第 2 図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号
//(C 12 P 13/08		
C 12 R 1:15)		
(C 12 P 13/08		
C 12 R 1:13)		
(C 12 N 1/20		
C 12 R 1:15)		
(C 12 N 1/20		
C 12 R 1:13)		
(C 12 P 13/06		
C 12 R 1:15)		
(C 12 P 13/06		
C 12 R 1:13)		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.